

## 평판막 및 실관막 모듈에 의한 단백질의 친화성 크로마토그래피에 관한 연구

이 광 진 · 염 경 호\*

충북대학교 공과대학 화학공학부  
(1998년 1월 30일 접수, 1998년 3월 5일 채택)

### A Study on Affinity Chromatography of Protein by Flat and Hollow-Fiber Membrane Module

Kwang-Jin Lee and Kyung-Ho Youm\*

School of Chemical Engineering, College of Engineering, Chungbuk National  
University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea  
(Received January 30, 1998, Accepted March 5, 1998)

**요 약** : Polysulfone 재질의 다공성 평판막 및 실관막에 키토산 피막층을 형성시킨 후 반응성 염료인 Cibacron Blue 3GA를 고정화시켜 human serum albumin(HSA)의 결합용량이 최대  $70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 인 단백질 친화성 막을 제조하였다. 친화성 평판막 모듈을 대상으로 HSA에 대한 용출 크로마토그래피 실험을 수행하여 eluent 용액의 최적 환경조건을 결정하였는바, 1 M KCl이 첨가된 농도 0.06 M, pH 10의 universal buffer를 eluent로 사용했을 때 리간드와 결합된 단백질의 용출이 가장 우수하였다. 친화성 평판막 및 실관막 모듈을 대상으로 HSA의 전열 크로마토그래피 실험을 수행하여 단백질에 대한 동적 결합용량을 측정하였다. 이 결과 동적 결합용량은 평판막 모듈의 경우에는 loading 용액의 유량과 HSA의 농도가 증가함에 따라 평형 결합용량 값으로부터 크게 감소하였으나, 실관막 모듈의 경우에는 loading 용액의 유량과 HSA의 농도에 관계없이 항상 평형 결합용량 수준을 유지하였는바, 따라서 실관막 모듈이 평판막 모듈보다 단백질 친화성 크로마토그래피 분리관으로서 더 효과적이었다.

**Abstract** : Protein affinity membranes were prepared via coating of chitosan gel on the porous flat and hollow-fiber polysulfone membranes, followed by the immobilization of the reactive dye (Cibacron Blue 3GA) to the chitosan gel. Maximum protein binding capacity of these affinity membranes was about  $70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Using the affinity flat membrane module, the elution chromatography of human serum albumin (HSA) was performed to determine the optimum condition of eluent buffer. The optimum condition of eluent was the universal buffer solution of 0.06 M concentration containing 1 M KCl at pH 10. For the frontal chromatography of HSA using the flat module, the dynamic protein binding capacity was rapidly decreased from the equilibrium values with increasing flow rate and HSA concentration of the loading solution. However, in the case of hollow-fiber module, the dynamic binding capacity was maintained an equilibrium value without depending on the operating conditions. These results showed that the hollow-fiber module was more effective than the flat module as an affinity chromatography column.

## 1. 서 론

최근 생물기술이 급속히 발전함에 따라 의약품, 식·음료품 및 향장품에 사용되는 다양한 생물제품들(예, 단백질, 효소, 항생제, 펩타이드, 핵산 등)이 대량 생산되면서, 이를 효율적·경제적으로 분리정제하는 기술개발의 요구가 높아지고 있다. 생물반응에 의한 제품 생산량은 극단적으로는 기질용액 1 g 당  $10^{-8}$  g 정도로까지 낮아[1], 이를 고순도로 정제하기 위해서는 다단계의 공정이 필요하여 분리정제의 비용이 크다. 따라서 생물제품의 산업적 생산이 경제성을 갖기 위해서는 생물제품을 보다 경제적으로 분리정제 할 수 있는 효율적인 공정개발이 필수적이다.

친화성 관 크로마토그래피(affinity column chromatography)법은 분리효율이 높아 단백질 및 효소류의 정제에 널리 사용되고 있는 기술이다[2, 3]. 친화성 관 크로마토그래피는 Agarose, Sepharose와 같은 마이크로 크기의 hydrogel bead에 친화성 리간드(ligand)를 결합시킨 입자들이 채워진 충전관을 사용하여 분리대상 물질(리게이트; ligate)과 리간드와의 상호작용에 의해 물질을 분리정제하는 방법으로서, 생체 물질의 분석 및 실험실적 고순도 정제에 널리 활용되고 있으며, 이를 분석규모에서 생산규모로 규모확대(scale-up)시키고자 하는 연구도 시도되고 있다[4, 5]. 그러나 충전관은 마이크로 크기의 단분산 입자를 사용함에 따라 압력강하가 높고(약 3 atm/cm depth), 고정상인 hydrogel bead의 압축에 의한 막힘(plugging)과 오염(fouling) 현상 때문에 이동상의 흐름이 작아 생산성이 낮다는 단점을 갖고 있다. 이러한 단점 때문에 충전관을 규모확대시켜 생산규모에 적용하는데는 한계가 있다[6, 7].

충전관이 갖는 단점인 높은 압력 강하, 관 막힘과 오염, 낮은 생산성, 규모확대의 어려움을 해결하고자 하는 노력의 하나로서 최근 다공성 막을 이용한 친화성 물질분리의 개념이 제안되었다. 다공성 막을 리간드의 고정화 담체로 사용하는 친화성 막(affinity membrane)은 충전관에 비해 상대적으로 이동상의 흐름이 원활해 압력강하가 작고 또한 이동상의 원활한 흐름이 물질전달을 촉진시켜 생산성이 높아져 규모확대가 용이하다는 장점이 있다[8, 9].

막을 리간드의 고정화 담체로 사용하는 친화성 조작은 친화성 막 여과(affinity filtration by membrane)법과 친화성 막 크로마토그래피(affinity chromatography by membrane)법으로 구분된다[10].

친화성 막 여과는 리간드가 고정화된 막의 세공을 통해 용액을 여과시킨 후 적절한 이동상으로 리간드와 결합된 목적물을 용출시켜 다시 막 세공을 통해 투과시키는 방식이며, 반면 친화성 막 크로마토그래피는 용액을 막 세공을 통해 투과시키지 않고 단지 막의 축방향으로만 흘려 보낸 후 리간드와 결합된 목적물을 적절한 eluent로 용출시키는 방식이다. 일반적으로 다공성 막으로는 평판막과 실관막 모두가 사용될 수 있으나, 실관막은 모듈 내에 막의 고밀도 충전이 가능하여 리간드의 고정화량을 크게 할 수 있다는 장점 때문에 평판막보다 유리하다. 또한 실관막 모듈을 크로마토그래피의 분리관으로 사용하면 실관막의 구조상 이동상이 실관막 내부를 직선적으로 흐르게 되므로 압력강하가 작고, 또한 실관막 세공은 충전관의 단분산 입자 충전에 상응하는 효과를 낼 수 있어 크로마토그래피 분리관으로서의 충분한 활용이 기대된다[9].

다공성 막을 이용하는 친화성 물질분리의 개념은 Brandt 등[11]에 의해 최초로 제안되었다. 이들은 산업적 규모로 생산되는 생물제품들의 분리정제에 이 방법을 적용시킬 경우 기대되는 장점들을 제시하였다. Champluvier와 Kula[12,13]는 nylon 재질의 평판막에 리간드를 고정화시킨 친화성 막을 사용한 막 여과법으로 효소를 분리정제하였다. Ding 등[9]은 실관막 모듈을 분리관으로 사용한 막 크로마토그래피법으로 역미셀(reversed micelle) 고정상에 의한 ketone 및 단백질 혼합액의 크로마토그래피적 분리를 연구한 바 있다. 최근 Kubota 등[14]은 친화성 실관막과 hydrogel bead 충전관의 단백질 결합 용량(binding capacity)과 생산성을 비교하여, 동일한 조건에서 실관막은 충전관에 상응하는 리게이트 결합 용량을 가지며 또한 막 세공을 통한 용액의 대류 흐름으로 물질전달이 촉진되어 충전관보다 생산성이 높음을 제시한 바 있다.

본 연구에서는 소수성인 polysulfone 재질의 평판막과 실관막에 키토산을 도포시켜 친수성 피막을 형성시킨 후, 여기에 단백질 친화성이 우수한 반응성 염료의 한 종류인 Cibacron Blue 3GA를 고정화시켜 제조된 막모듈을 분리관으로 사용하여 human serum albumin(HSA)에 대한 친화성 막 크로마토그래피를 연구하였다. 친화성 평판막 및 실관막 모듈의 용출 분리율과 단백질 결합용량을 eluent 용액의 환경조건(완충액의 농도, pH, 염의 종류와 농도)과 크로마토그래피 조작조건(이동상 유량과 단백질 부하량)의 변화에 따라 검토하여 친화성 막모듈의 크로마토그래피 분리관으로서의 활용 가능성을 검

토하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험재료

친화성 막의 제조에는 polysulfone(PS) 재질의 다공성 평판막 및 실관막을 사용하였다. 평판막으로는 분획 분자량(molecular weight cut-off) 300,000 달톤인 PTMK막(미국 Millipore Co.)을 사용하였다. 실관막으로는 Superane 막[한국 (주)선경인더스트리]을 사용하였다. 이 실관막은 외경과 내경이 각각 1300  $\mu\text{m}$ , 800  $\mu\text{m}$ 이며, 다공도는 25 ~ 35 %, 세공크기는 0.01 ~ 0.1  $\mu\text{m}$  범위이다.

PS막에 도포될 피막 물질로는 평균 분자량 750,000인 키토산(chitosan, 스위스 Fluka Chemie AG)을 사용하였다. 키토산[poly(2-amino-2-deoxy-D-glucose)]은 키틴(chitin)이 탈아세틸화된 선형 고분자 유도체로서 수산기(-OH)와 아민기(-NH<sub>2</sub>)를 갖고 있어 리간드로 사용된 반응성 염료의 염소기(-Cl)와 쉽게 결합하여 키토산-반응성 염료 친화성 막의 제조가 가능하다[15].

리간드로는 Cibacron Blue 3GA(CB3GA, 염료 함량 55 % 용액, 미국 Sigma Co.)를 사용하였다. CB3GA는 직물 염색에 널리 사용되고 있는 triazine 염료의 한 부류인 Procion H 계열의 반응성 염료로서 그 구조가 NAD (nicotinamide adenine dinucleotide)와 흡사하여, 'dinucleotide fold'를 갖고 있는 단백질들(예, dehydrogenase류, kinase류, nucleotide-binding 효소류 및 serum albumin 등)과 강한 친화성 작용을 나타낸다[16].

분리대상 단백질로는 human serum albumin (HSA, fraction V, 96~99 % 함량, 분자량=68,000, 등전점=pH 4.9, 미국 Sigma Co.)을 사용하였다. 친화성 막모듈에 의한 크로마토그래피 실험시 이동상으로는 universal buffer(acetic acid + boric acid + phosphoric acid)를 사용하였으며, 이동상의 pH는 NaOH 용액으로 조절하였다. 이외의 기타 시약들은 모두 특급 시약을 사용하였으며, 순수로는 Milli-RO'/Milli-Q' 순수 제조기(미국 Millipore Co.)로부터 생산된 순수(resistivity 18.2 M $\Omega$ -cm)를 사용하였다.

### 2.2. 크로마토그래피 장치

친화성 막모듈에 의한 단백질의 크로마토그래피 실험에 사용된 장치는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 용매 펌프(M510, 미국 Waters Co.), 시료 주입밸브

(U6K, 미국 Waters Co.), UV/Vis 검출기(M486, 미국 Waters Co.)와 크로마토그램 workstation(Baseline 810, 미국 Waters Co.)으로 구성된 통상의 HPLC에 친화성 막모듈을 연결시켜 사용하였다. 이 크로마토그래피 장치에 연결된 평판막 모듈은 perspex 판(재질 PMMA)으로 제작하였다. 상하의 perspex 판 사이에는 실리콘 고무로 유효 막면적이 11 cm<sup>2</sup>(길이 11 cm × 폭 1 cm)이 되도록 높이 0.23 cm의 긴 유로를 만들고, 그 밑에 친화성 막을 삽입한 후 상하의 perspex 판을 볼트와 너트로 조여 모듈을 완성하였다. 실관막 모듈은 투명한 테프론 튜브 내에 50가닥의 실관막을 에폭시 수지로 포팅(potting)

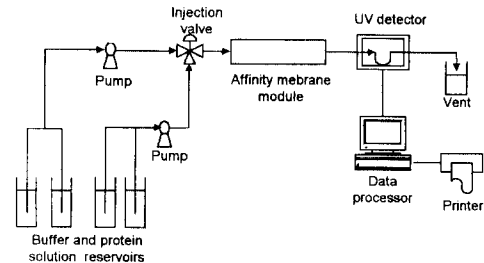
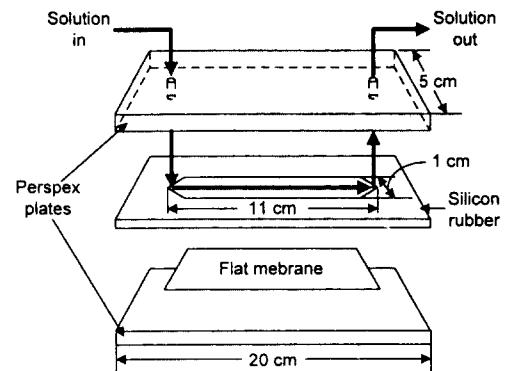
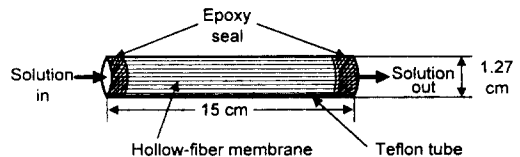


Fig. 1. Set-up of chromatography system.



(a) Flat membrane module



(b) Hollow-fiber membrane module

Fig. 2. Affinity membrane modules.

시켜 제작하였다. 사용된 막모듈의 형상과 제원을 Fig. 2에 나타내었다.

2.3. 실험방법

2.3.1. 친화성 막모듈의 제조

1) 평판막 모듈

PS 평판막의 단백질 친화성화 작업은 ① 1단계: 막표면의 키토산 피막의 형성, ② 2단계: 키토산 피막에의 CB3GA의 고정화, ③ 3단계: 세척의 절차로서 수행하였다. 이 친화성화 작업은 Atkinson 등[17]이 제안한 hydrogel bead에의 반응성 염료 고정화법을 준용한 것으로서 상세한 절차를 Fig. 3에 나타내었다.

1단계로 먼저 3 cm × 15 cm 크기로 절단한 PS 평판막을 0.1 M NaOH 용액에 10분간 담가 막 보호액인 글리세롤을 제거한 후 순수수중에서 30분간 초음파 세척하고 건조시킨다. 이 막을 유리판 위에 능동층이 위로 향하게 부착시킨 다음, 표면에 키토산 용액 5 ml를 붓고 캐스팅하여 키토산 용액을 도포시킨다. 이때 키토산 용액은 1 % (wt/vol) 아세트산 용액 100 ml에 1 g의 키토산을 녹인 후 glass filter(2G-2, 일본 Sanko Co.)로 불용성분을 여과시켜 제조하였다. 이 막을 대기중에서 30분간 풍건한 후 다시 60°C에서 2시간 건조시킨 다음, 알카리 용

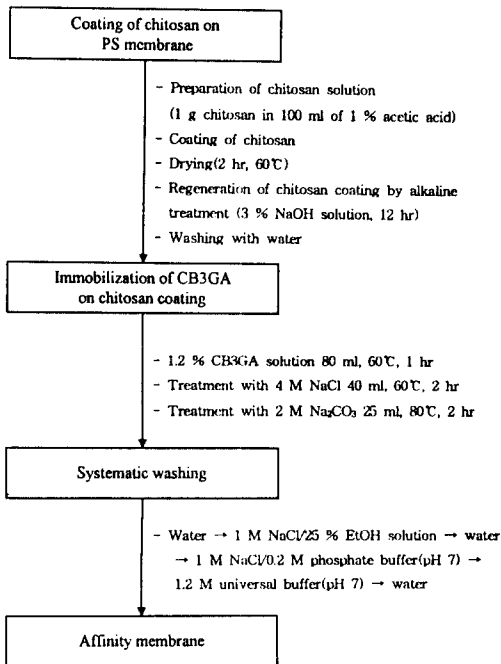


Fig. 3. Preparation procedure of affinity membranes.

액(3 g NaOH/100 ml 순수수)에 12시간 동안 담가 키토산 겔 피막을 형성시키고 과량의 순수수로 세척한 후 순수수에 보관하였다.

2단계로 형성된 키토산 피막에 반응성 염료인 CB3GA를 고정화시켰다. Fig. 4에 나타낸 바와 같이 약알카리 조건하에서 CB3GA의 triazine 고리에 있는 염소기(-Cl)는 키토산의 수산기(-OH)나 아민기(-NH<sub>2</sub>)와 친핵성 치환반응을 통해 공유결합을 형성한다[15]. 먼저 CB3GA 용액 0.96 g을 80 ml의 순수수에 용해시킨다. 이 용액을 60°C로 가열하고 여기에 키토산 피막이 형성된 평판막을 1시간 동안 침적시킨 후, 4 M NaCl 용액 40 ml를 첨가하여 염료 용액의 이온강도를 높여 염료 분자가 키토산의 비결정 부분으로까지 확산되어 키토산 분자사슬에 잘 흡착되도록 한다. 2시간 후 여기에 약알카리인 2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 25 ml를 첨가시키고 80°C에서 2시간 동안 탈수 축합반응시킨 다음, 실온에서 냉각시켜 키토산 피막에 반응성 염료를 고정화시켰다.

3단계로 반응성 염료가 고정화된 막을 세척하여 친화성 평판막을 완성하였다. 위의 염료 용액을 서서히 순수수로 대체하여 과란 색이 없어질 때까지 희석시켜 미반응된 염료를 제거한 후, 막을 꺼내 다단계의 세척 과정[순수 → 1 M NaCl/25% EtOH 용액 → 순수 → 1 M NaCl/0.2 M phosphate buffer(pH 7) → 순수 → 1.2 M universal buffer(pH 7) → 순수]을 거쳐 염료가 키토산 피막에 단단히 고정화되도록 하여 친화성 평판막을 완성하였다. 완성된 친화성 막은 미생물에 의해 손상되지 않도록 0.4 wt % Na<sub>2</sub>N 용액중에 보관하였으며, 사용시에는 과량의 순수수로 세척한 후 Fig. 3-a)의 평판막 모듈에 장착시켰다.

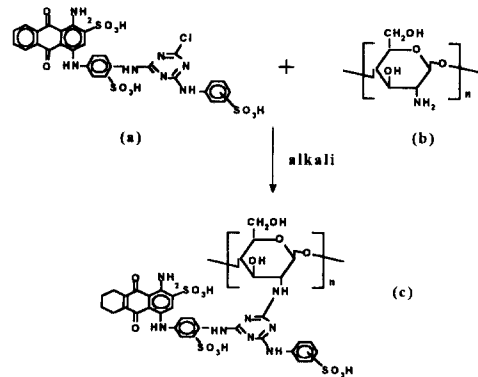


Fig. 4 Reaction scheme of coupling of CB3GA(a) with chitosan(b).

## 2) 실관막 모듈

실관막 모듈은 테프론 재질(PFA)의 투명 튜브(외경 12.7 mm, 내경 10 mm, 유효길이 15 cm) 내에 실관막 50가닥을 예폭시 수지로 포팅(potting)시켜 제작하였다. 먼저 실관막들의 양끝을 접착 테이프 위에 일정한 간격으로 나란히 붙인 후 감아서 실관막 bundle을 마련한다. 예폭시 수지가 실관막들의 내부로 유입되어 막의 유로가 막히는 것을 방지하기 위해 이 bundle의 양끝을 2액 액상 실리콘(RTV 615, 미국 General Electric Co.)으로 실링한 후 테프론 튜브 내에 넣는다. 예폭시 수지(AY103, 스위스 Ciba-Geigy Co.)와 경화제(HY956, 스위스 Ciba-Geigy Co.)를 100 : 20의 무게비로 혼합시킨 수지 용액에 실관막 bundle이 삽입된 튜브의 양끝 약 1.5 cm를 담가 실관막에 예폭시 수지를 침지(dipping)시킨다. 침지된 예폭시 수지를 60°C에서 20분 동안 반경화시킨 후, 실리콘 실링부분을 잘라내고, 대기중에서 완전히 경화시켜 실관막 모듈을 완성하였다.

제작된 실관막 모듈을 단백질의 크로마토그래피 분리관으로 사용하기 위해서는 실관막의 내부 표면을 친화성화시켜야 한다. 실관막 모듈의 친화성화 작업은 앞에서 설명한 친화성 평판막 제조과정 및 조건과 전적으로 동일하나, 실관막 모듈의 구조상 회분식 작업이 불가능하므로 모든 반응용액들을 정량 펌프(QSY-1CSC, 미국 FMI Co.)로서 실관막 모듈 내로 연속 주입시키면서 친화성화 작업을 수행하였다.

## 2.3.2. HSA의 평형 결합용량 측정

제조된 친화성 평판막을 대상으로 HSA의 흡착 실험을 수행하여 친화성 막에 대한 단백질의 평형 결합용량(equilibrium binding capacity)을 측정하였다. HSA의 흡착 실험은 아래의 절차로서 수행하였다. 제조된 친화성 평판막을 가로 4 cm × 세로 4 cm 크기로 잘라 5 ml의 완충용액에 30 분간 침적시킨 후, 여기에 서로 다른 농도의 HSA 용액 5 ml를 첨가하고, 25°C, 60 rpm에서 12시간 동안 진탕시켜 흡착평형에 도달하도록 한다. 이 막을 꺼내 완충용액에서 서서히 흔들어 주어 약하게 결합된 HSA를 제거한 후, 다시 1 M KCl이 첨가된 10 ml의 완충용액에 담가 25°C, 60 rpm에서 6시간 동안 진탕시켜 HSA를 탈착시킨다. 이렇게 하여 얻어진 용액의 흡광도를 HSA의 최대 흡수파장인 280 nm에서 UV/Vis 분광광도계로 측정하여 친화성 막에의 HSA의 평형 결합용량( $\mu\text{g HSA}/\text{cm}^2$  막면적)을 계

산하였다.

## 2.3.3. Eluent의 최적 조건 선정

친화성 크로마토그래피법으로 단백질을 분리정제할 때, 리간드와 결합된 단백질의 용출정도는 사용된 eluent 완충용액의 농도 및 pH와 이 완충용액에 첨가시킨 염의 종류 및 농도 등의 환경조건에 따라 달라진다[16].

본 연구에서 eluent로 사용된 universal buffer의 최적 환경조건은 친화성 평판막 모듈을 Fig. 1의 크로마토그래피 장치에 연결시켜 HSA의 용출 크로마토그래피(elution chromatography) 실험을 통해 결정하였다. 염이 첨가되지 않은 pH 5의 완충용액을 항상 1 ml/min의 유량으로 막모듈에 도입시킨 상태에서 HSA 100  $\mu\text{g}$ 을 순간적으로 주입하고, 리간드와 결합된 HSA를 pH(6 ~ 11)와 농도(0.03 ~ 0.3 M), 첨가된 염의 종류(no salt, NaCl, KCl)와 농도(0.05 ~ 2.0M)를 달리하여 제조한 각각의 universal buffer를 eluent로 사용하여 용출시키는 용출 크로마토그래피 실험을 수행하였다. 이 실험을 통해 얻어진 용출 크로마토그램으로부터 아래의 식으로 HSA의 용출 분리율(separation ratio, SR)을 계산하고, 이 값이 최대가 되는 조건을 eluent의 최적 조건으로서 선정하였다.

$$SR = \text{Elution Area} / (\text{Overload Area} + \text{Elution Area}) \quad (1)$$

여기서 과부하 면적(overload area)이란 친화성 막의 결합용량 이상으로 HSA를 주입시킴에 따라 리간드에 결합되지 못하고 그대로 이동상을 따라 막모듈 밖으로 유출된 크로마토그램 피크의 면적을 뜻하며, 용출 면적(elution area)이란 리간드에 결합된 HSA를 eluent로 용출시켜 얻은 크로마토그램 피크의 면적을 뜻한다. 이때 분리율이 1이면 주입된 단백질 모두가 리간드와 결합됨을 의미하며, 1보다 작으면 주입된 단백질의 일부만이 리간드와 결합됨을 의미한다.

## 2.3.4. HSA의 전열 크로마토그래피 실험

친화성 평판막 및 실관막 모듈을 Fig. 1의 장치에 연결시킨 후 HSA에 대한 전열 크로마토그래피(frontal chromatography) 실험을 수행하여 2종류 막모듈의 친화성 크로마토그래피 분리관으로서의 활용 가능성과 단백질에 대한 동적 결합용량(dynamic binding capacity)을 검토하였다.

전열 크로마토그래피 실험은 먼저 HSA를 함유한 pH 5의 순 완충용액(loading 용액)을 막모듈에 연속적으로 흘려 보내 파과곡선(breakthrough curve)이 얻어질 때까지 HSA를 loading시킨다. 파과곡선이 얻어지면 loading 용액의 도입을 중단한다. 그 다음 순 완충용액(pH 5)을 항상 1 ml/min의 유량으로 도입시켜 리간드와 결합되지 않은 HSA를 washing시킨 후, 다시 1 M KCl이 함유된 pH 10의 buffer 용액을 항상 1 ml/min(Q<sub>2</sub>)의 유량으로 도입시켜 리간드와 결합된 HSA를 용출시킨다. 이 일련의 과정을 통해 loading/washing/elution으로 구성된 전열 크로마토그램을 얻고, 용출곡선의 면적으로부터 막모듈들의 동적 단백질 결합용량을 계산하였다. 전열 크로마토그래피 실험의 조작조건으로는 loading 용액의 HSA 농도를 50 µg/ml와 500 µg/ml로, 유량(Q<sub>1</sub>)을 0.5 ~ 4 ml/min로 변화시켜 실험하여, 동적 단백질 결합용량에 미치는 loading 용액의 농도 및 유량의 영향을 검토하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. HSA의 평형 결합용량

친화성 막의 HSA에 대한 평형 흡착량(결합용량)을 측정하여 이를 Fig. 5에 나타내었다. 이 결과 막 단위 면적당 흡착된 HSA의 양은 400 µg/ml 이하의 낮은 농도에서는 HSA 용액의 농도가 증가함에 따라 거의 직선적으로 증가하며, 그 이상의 농도에서는 증가율이 점차 감소하여 평형에 도달하는 전형적인 Langmuir 흡착거동을 나타내었다. 일반적으로 단백질과 리간드인 CB3GA는 1 : 1 결합을 하는 것으로 알려져 있으며[17], 따라서 Fig. 5의 결과를 아래의 단분자 흡착에 대한 Langmuir 등온식으로 해석하였다.

$$q = q_m C / (K + C) \quad (2)$$

여기서 C는 HSA 용액의 농도(µg/ml), q는 HSA의 평형 결합용량(µg/cm<sup>2</sup>), q<sub>m</sub>은 최대 평형 결합용량(µg/cm<sup>2</sup>), K는 Langmuir 상수(µg/ml)이다.

Fig. 5의 흡착실험 결과를 식(2)에 적용시킨 결과, 본 연구에서 제조한 친화성 막의 최대 HSA 평형 결합용량(q<sub>m</sub>)은 70 µg/cm<sup>2</sup>이었으며, 상수 K는 155 µg/ml이었다.

#### 3.2. Eluent의 최적 조건

친화성 막에 결합된 단백질의 효과적 용출을 위한 eluent의 최적 조건은 eluent로 사용된 universal

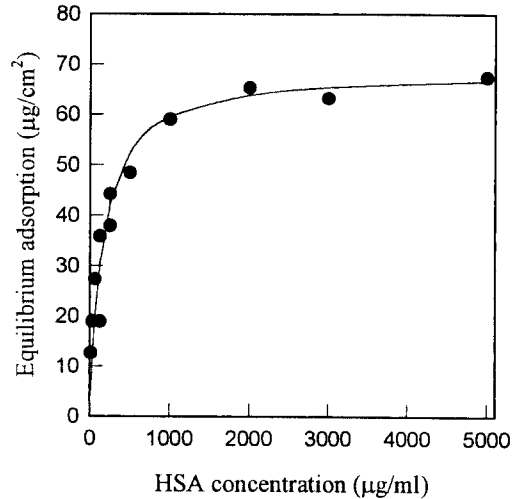


Fig. 5. Equilibrium adsorption of HSA on affinity membrane.

buffer의 pH와 농도, 첨가된 염의 종류와 농도를 달리하여 제조된 완충용액을 사용하여 친화성 평판막 모듈에서 HSA의 용출 분리율(SR)을 측정하고, 이 값이 최대가 되는 조건으로서 선정하였다.

#### 3.2.1. 완충용액의 pH와 농도

일반적으로 단백질의 용해도는 용액의 pH에 따라 크게 달라진다. 등전점(isotropic point, pI)이 4.9인 HSA는 등전점일 때 용해도가 가장 작으며, 등전점에서 멀어질수록 용해도가 증가한다[16]. 따라서 친화성 크로마토그래피법으로 HSA를 효과적으로 분리정제하기 위해서는 등전점의 pH 조건에서 HSA를 주입하여야만 리간드와의 결합이 최대가 되며, 결합된 HSA는 등전점과는 다른 pH 조건에서 용출시키는 것이 바람직하다. 따라서 본 연구의 모든 실험에서 친화성 막모듈에의 HSA 주입은 이동상의 pH가 HSA의 등전점인 5의 조건에서 행하였다.

HSA의 주입량이 100 µg, 이동상의 유량이 1 ml/min인 조건에서 리간드와 결합된 HSA를 용출시킬 때 pH 10의 eluent를 사용하여 얻은 전형적인 용출 크로마토그램의 한 예를 Fig. 6에 나타내었다. 이 크로마토그램에서 a점은 pH 5의 이동상 흐름에 HSA를 주입시킨 시점이며, b점은 리간드와 결합된 HSA를 용출시키기 위해 pH 10의 완충용액으로 이동상을 교체시킨 시점이다. Fig. 6에서 첫 번째 피크는 과부하 피크(overload peak), 두 번째 피크는 용출 피크(elution peak)를 나타내며, 이들 피크의 면적으로부

터 식(1)에 의해 HSA의 용출 분리율을 계산하였다.

리간드와 결합된 HSA의 용출시 사용될 eluent의 최적 pH 조건을 선정하기 위해 완충용액의 pH에 따른 용출 분리율을 측정하여 그 결과를 Fig. 7-a)에 나타내었다. 이때 pH 5 이하에 대해서는 용출 분리율 측정 실험을 수행하지 않았는바, 산성 조건에서는 키토산 피막이 PS 막표면으로부터 탈리되기 때문이다. 이 결과 Fig. 7-a)에 나타낸 바와 같이 HSA의 용출 분리율은 eluent의 pH가 10까지는 점차 증가하나, 11에서는 급격히 감소하였다. 이는 용액이 강 알칼리 조건이 되면 단백질의 구조가 변화되는 비가역적 변성이 일어나 오히려 리간드인 CB3GA와의 결합이 더 강해지기 때문으로 사료된다[18]. 따라서 HSA의 용출시 사용될 eluent로는 pH 10의 완충용액을 사용하는 것이 가장 바람직하였다.

HSA 용출시 사용된 universal buffer의 농도에 따른 용출 분리율 변화를 Fig. 7-b)에 나타내었다. 이 결과 완충용액의 농도가 0.06 M(0.02 M acetic acid + 0.02 M boric acid + 0.02 M phosphoric acid)일 때 분리율이 가장 높았다. 이는 완충용액의 이온농도가 적정한 수준에 달하면 이온들이 단백질의 소수성 patch 부분과 물과의 친화력을 높게 하여 단백질의 용출을 증가시키는 salt-in 효과 때문으로 사료된다[16].

3.2.2. 염의 종류와 농도

리간드와 결합된 HSA의 용출시 염을 첨가하지 않

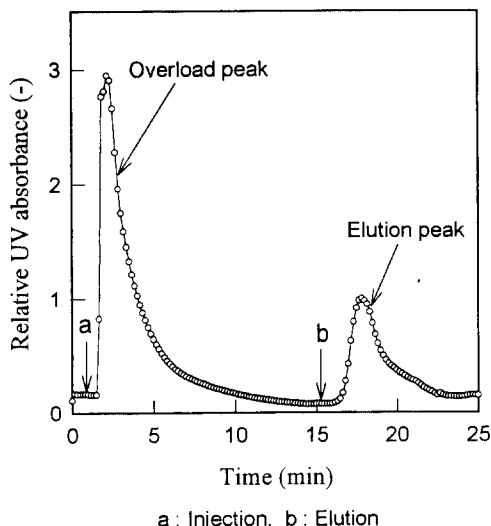


Fig. 6. Typical elution chromatogram of HSA. [Eluent conditions : pH = 10, buffer conc. = 0.06M, KCl conc. = 1M]

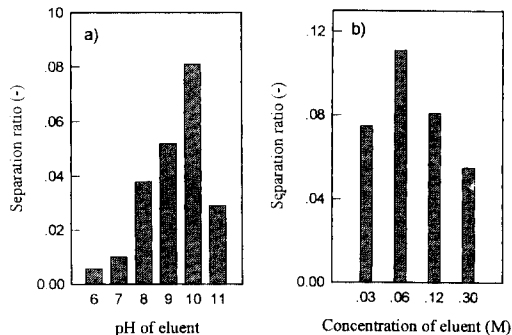


Fig. 7. Separation ratio of HSA with changes of pH and concentration of eluent buffer. [Eluent conditions : a) buffer conc. = 0.12M, no salt, b) pH = 10, no salt]

은 순 완충용액 및 NaCl과 KCl이 첨가된 완충용액을 eluent로 사용한 경우의 용출 분리율을 Fig. 8-a)에 나타내었다. 이 결과 KCl이 첨가된 용액을 eluent로 사용한 경우가 염을 첨가하지 않은 경우 및 NaCl이 첨가된 경우보다 용출 분리율이 높게 나타났다. 즉, 리간드와 결합된 HSA를 효과적으로 용출시키기 위해서는 KCl이 첨가된 완충용액을 eluent로 사용하는 것이 보다 유리함을 알 수 있다. 이는 K 이온이 Na 이온보다 이온 반경이 크기 때문에 물에 대한 이온-쌍극자 인력이 커서 단백질을 둘러싸고 있는 물분자를 KCl이 더 많이 제거시키므로 리간드와 결합된 단백질의 응집을 유발시켜(salt-out 효과) HSA의 용출이 더 크게 일어나기 때문이다[16].

Eluent 용액에 첨가시킨 KCl의 농도에 따른 용출 분리율 변화를 Fig. 8-b)에 나타내었다. 이 결과 용출 분리율은 KCl의 농도가 커질수록 증가하나, 1 M 이상이 되면 salt-out 효과가 최대가 되어 더 이상 증가하지 않았다. 따라서 eluent에 첨가할 최적의 KCl 농도로서 1 M을 선정하였다.

이상의 실험결과를 종합하면 리간드와 결합된 HSA를 효과적으로 용출시키기 위한 eluent의 최적 조건은 1 M KCl이 첨가된 농도 0.06 M, pH 10의 universal buffer를 사용한 경우이었으며, 따라서 다음의 친화성 막모듈에 의한 HSA의 전열 크로마토그래피 실험은 이 최적 조건의 eluent를 사용하여 수행되었다.

3.3. HSA의 전열 크로마토그래피

친화성 평판막 및 실관막 모듈 각각을 사용하여 얻은 전형적인 크로마토그램들을 Fig. 9에 나타내었다.

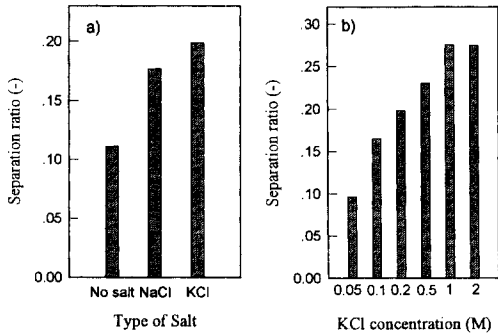


Fig. 8. Separation ratio of HSA with changes of salt type and KCl concentration in eluent buffer.

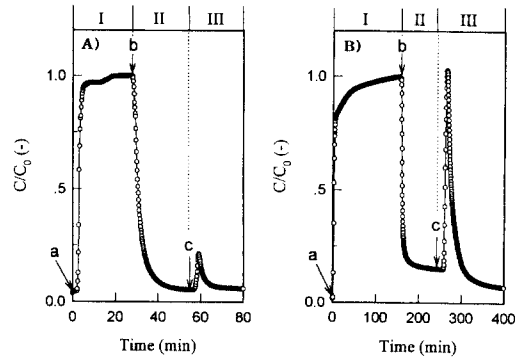
[Eluent conditions : a) pH = 10, buffer conc. = 0.06M, salt conc. = 0.2M, b) pH = 10, buffer conc. = 0.06M]

여기서 a점은 HSA를 함유한 pH 5의 loading 용액을  $Q_1$ 의 유량으로 도입시킨 시점이며, b점은 파과곡선이 얻어진 후 막모듈을 세척시키기 위해 pH 5의 순 완충용액을 1 ml/min의 유량으로 도입시킨 시점이며, c점은 리간드와 결합된 HSA를 용출시키기 위해 1 M KCl이 함유된 농도 0.06 M 및 pH 10의 eluent를 1 ml/min의 유량( $Q_2$ )으로 도입시킨 시점이다. 이들 전열 크로마토그램에서 첫 번째 곡선은 HSA의 파과곡선이며, 두 번째 곡선은 세척곡선, 세 번째 곡선은 리간드와 결합된 HSA의 용출곡선이다. 즉, 이 세 번째 용출곡선 밑부분의 면적이 리간드와 결합된 HSA의 양에 해당하며, 따라서 이로부터 막모듈의 동적 단백질 결합용량을 아래의 식으로서 계산하였다.

$$E = C_0 Q_2 \int_a^\beta \frac{C}{C_0} dt / \text{Membrane Area} \quad (3)$$

여기서,  $E$ 는 막모듈의 동적 단백질 결합용량( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ),  $C_0$ 는 loading 용액의 단백질 농도( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),  $C$ 는 용출곡선 상의 각 지점에서의 단백질 농도( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),  $Q_2$ 는 eluent의 유량(ml/min),  $a$ 는 용출 시작시점(min),  $\beta$ 는 용출 완료시점(min)이다.

위의 계산을 통해 얻은 친화성 평판막 및 실관막 모듈에 대한 HSA의 동적 결합용량을 크로마토그래피 조작조건에 따라 Fig. 10에 나타내었다. 이 결과 평판막 모듈의 경우 loading 용액의 HSA 농도가 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 일 때는 유량  $Q_1$ 이 증가하여도 동적 결합용량이 평형 결합용량에 비해 그다지 크게 감소하지 않았으나,



I : Breakthrough curve, II : Washing curve, III : Elution curve

Fig. 9. Typical frontal chromatograms.

[HSA conc. = 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $Q_1$  = 3ml/min, a) Flat module, b) Hollow-fiber module]

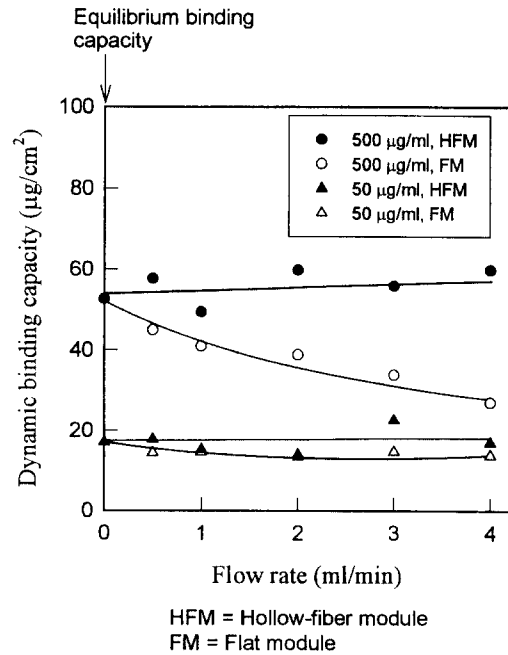


Fig. 10. Dynamic protein binding capacity of flat and hollow-fiber membrane modules.

500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 일 때는 평형 결합용량(유량이 0인 상태에서의 결합용량) 값인 52.7  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 약 50% 정도인 27  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 으로 급격히 감소하였다. 이처럼 평판막 모듈의 동적 결합용량이 평형 결합용량 값으로부터 크게 감소하는 일차적 이유는 유량  $Q_1$ 이 증가함에 따라 막표면에 작용하는 전단력이 커지고 용액의 체



류시간이 작아져 리간드와의 HSA 결합량이 작아지기 때문이나, 본질적으로는 막모듈이 평판형이기 때문에 모듈 단위 부피당 충전된 막면적이 작기 때문으로 생각된다. 그러나 친화성 실관막 모듈의 경우에는 loading 용액의 HSA 농도와 유량에 관계없이 동적 결합용량은 항상 평형 결합용량 수준을 유지하였는바, 따라서 실관막 모듈이 평판막 모듈보다 단백질 친화성 크로마토그래피 분리관으로서 더 효과적이었다.

#### 4. 결론

Polysulfone 재질의 다공성 평판막과 실관막에 키토산 피막을 도포한 후, 리간드로 반응성 염료인 Cibacron Blue 3GA를 고정화시켜 단백질 친화성 막을 제조하고, 이 친화성 막모듈을 분리관으로 사용하여 HSA의 크로마토그래피 실험을 수행한 결과 다음의 결론을 얻었다.

- (1) Polysulfone 막에 키토산 피막층을 형성시킨 후, 반응성 염료인 CB3GA를 고정화시킴으로써 결합용량이 최대  $70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 인 단백질 친화성 막을 제조할 수 있었다.
- (2) 리간드와 결합된 단백질의 용출시 1M의 KCl이 첨가된 pH 10, 농도 0.06 M(0.02 M acetic acid + 0.02M boric acid + 0.02M phosphoric acid + 0.06 M NaOH)의universal buffer를 eluent로 사용할 때 단백질 용출효과가 가장 우수하였다.
- (3) HSA의 전열 크로마토그래피 실험 결과 단백질의 동적 결합용량은 평판막 모듈의 경우에는 loading 용액의 유량과 농도가 증가함에 따라 평형 결합용량 값으로부터 크게 감소하였으나, 실관막 모듈의 경우에는 loading 용액의 유량과 농도에 관계없이 항상 평형 결합용량 수준을 유지하였는바, 따라서 실관막 모듈이 평판막 모듈보다 단백질 친화성 크로마토그래피 분리관으로서 더 효과적이었다.

#### 감 사

본 연구 수행에 필요한 실관막을 제공해 주신 (주)선경인더스트리에 감사드립니다.

#### 참 고 문 헌

1. P. A. Belter, E. L. Cussler and W. S. Hu, "Bio-separations: Downstream Processing for Biotechnology", John Wiley & Sons, Singapore, pp. 1-9 (1988).
2. P. D. G. Dean, W. S. Johnson and F. A. Middle, "Affinity Chromatography: A Practical Approach", IRL Press, Washington, D. C., pp. 1-30 (1985).
3. C. R. Lowe and P. D. G. Dean, "Affinity Chromatography", John Wiley & Sons, Chichester, pp. 52-70 (1974).
4. S. J. Gibbs and E. N. Lightfoot, *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, 25(4), 490 (1986).
5. M. R. Ladisch, M. Voloch and B. Jacobson, *Biotech. & Bioeng. Symp.* No. 14., 525 (1984).
6. F. H. Arnold, H. W. Blanch and C. R. Wilke, *Chem. Eng. J.*, 30, B9 (1985).
7. R. P. W. Scott, "Liquid Chromatography Column Theory", John Wiley & Sons, New York, pp. 237-264 (1992).
8. K. G. Briefs and M. R. Kula, *Chem. Eng. Sci.*, 47, 141 (1992).
9. H. Ding, M. C. Yang, D. Schisla and E. L. Cussler, *AIChE J.*, 35(5), 814(1989).
10. K. J. Lee, "Separation Characteristics of Protein by Affinity Chromatography Using Membrane Modules", Master Thesis, Dept. of Industrial Chem. Eng., Chungbuk Nat. Univ., Chungbuk. (1997).
11. S. Brandt, R. A. Goffe, S. B. Kessler, J. L. O'Connor and S. E. Zale, *Bio/Technology*, 6, 779 (1988).
12. B. Champluvier and M. R. Kula, "Separations for Biotechnology", D. L. Pyle, ed., Elsevier, New York, pp. 295-304 (1990).
13. B. Champluvier and M. R. Kula, *J. Chromatogr.*, 539, 315 (1991).
14. N. Kubota, S. Miura, K. Saito, K. Sugita, K. Watanabe and T. Sugo, *J. Memb. Sci.*, 117, 135 (1996).
15. X. Zeng and E. Ruckenstein, *J. Memb. Sci.*, 117, 271 (1996).
16. R. K. Scopes, "Protein Purification", 2nd ed., Springer-Verlag, New York, pp. 42-145 (1987).
17. T. Atkinson, P. M. Hammond, R. D. Hartwell, P. Hughes, M. D. Scawen, R. F. Sherwood, D. A. P. Small, C. J. Bruton, M. J. Harvey and C. R. Lowe, *Biochem Soc. Trans.*, 9, 290 (1981).
18. J. A. Asenjo, "Separation Processes in Biotechnology", Marcel Dekker, New York, pp. 401-445 (1980)